

· 临床研究 ·

切除修复交叉互补酶1等常见耐药相关蛋白在伴神经侵犯胃癌中的表达

戴东方,陈德玉,李小琴,顾汉刚,陶清,王德强*

江苏大学附属医院肿瘤科,江苏 镇江 212001

[摘要] 目的:检测切除修复交叉互补酶1(excision repair cross-complementation group 1, ERCC1)等常见耐药相关蛋白在伴神经侵犯胃癌患者中的表达。方法:回顾性分析242例胃腺癌患者的临床资料,免疫组化染色检测肿瘤组织中ERCC1、微管蛋白 β 3、胸苷酸合酶(thymidylate synthase, TS)、DNA拓扑异构酶2(topoisomerase 2-alpha, TOP2A)及P糖蛋白的蛋白表达水平,比较有和无神经侵犯者上述分子标志物表达的差异。结果:108例(44.6%)有神经侵犯,其肿瘤最大径 ≥ 5 cm、低分化、伴肿瘤脉管侵犯及TNM分期III~IV期的比例均显著高于无神经侵犯者($P < 0.05$)。伴神经侵犯者的ERCC1高表达率显著高于无神经侵犯者(63.9% vs. 46.5%, $P < 0.05$),而其他耐药相关蛋白的高表达率在两组间均无统计学差异($P > 0.05$)。亚组分析显示,有和无神经侵犯者之间ERCC1高表达率的差异主要出现于男性(64.8% vs. 43.1%, $P=0.026$)和肿瘤低分化的患者中(76.3% vs. 42.9%, $P=0.006$)。结论:伴神经侵犯胃癌患者的ERCC1蛋白表达水平升高,提示了神经侵犯影响化疗疗效的可能原因。

[关键词] 胃癌;神经侵犯;切除修复交叉互补酶1**[中图分类号]** R735.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)11-1584-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20191107

Expression of chemotherapy resistance associated proteins including excision repair cross-complementation group 1 in gastric cancer patients with perineural invasion

Dai Dongfang, Chen Deyu, Li Xiaoqin, Gu Hangang, Tao Qing, Wang Deqiang*

Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions of proteins associated with chemotherapy resistance including excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) in gastric cancer patients perineural invasion (PNI). **Methods:** A retrospective study was conducted in 242 patients with gastric adenocarcinoma. The expressions of tubulin β 3, thymidylate synthase (TS), P-glycoprotein, topoisomerase 2-alpha (TOP2A) and ERCC1 were detected by immunohistochemistry in paraffin-embedded tumor tissues and were compared between patients with and without PNI. **Results:** PNI was detected in 108 patients (44.6%), and the proportions of patients with the longest diameter of tumor ≥ 5 cm, poor histological differentiation, lymphovascular invasion and TNM stages of III ~ IV were significantly higher in these patients than those in patients without PNI ($P < 0.05$). The high expression rate of ERCC1 in patients with PNI was significantly higher than those in those without PNI (63.9% vs. 46.5%, $P < 0.05$), and this difference was mainly found in subgroups of male (64.8% vs. 43.1%, $P=0.026$) and poor differentiation (76.3% vs. 42.9%, $P=0.006$). The high expression rates of tubulin β 3, TS, P-glycoprotein and TOP2A were not significantly different between these two groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** Gastric cancer patients with PNI had an increased expression level of ERCC1 protein, indicating the possible mechanism of poor chemotherapy effect induced by PNI.

[Key words] gastric cancer; perineural invasion; excision repair cross-complementation group 1

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(11): 1584-1588]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81301765);江苏省青年医学重点人才项目(QNRC2016829);镇江市科技计划项目(SH2015054, SH2016038);江苏大学附属医院“5123”人才计划(51232017301)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: deqiang_wang@aliyun.com

我国胃癌的发病率和病死率均位列恶性肿瘤的第2位,每年新发胃癌病例居世界首位,严重威胁人民群众的健康和生命^[1-2]。胃癌最主要的治愈方法仍然是根治性手术,但患者术后普遍面临复发转移风险,部分患者预后不良。术后辅助化疗能够显著降低患者的复发转移风险并改善不良预后,但并非所有患者都能从中获益^[3-4]。最近一些研究发现肿瘤伴神经侵犯与包括胃癌在内的多种肿瘤术后辅助化疗的疗效有关,伴神经侵犯者的无病生存(disease-free survival, DFS)和总生存(overall survival, OS)时间均较无神经侵犯者显著缩短,提示伴神经侵犯者化疗敏感性降低,但是其机制仍不清楚^[5-8]。因此,本研究回顾性比较了有和无神经侵犯胃癌患者常见的5种耐药相关蛋白表达水平的差异,初步探讨伴神经侵犯胃癌的耐药原因。

1 对象和方法

1.1 对象

2012年1月1日—2014年1月1日在江苏大学附属医院行手术治疗的胃癌患者,纳入标准:①病理学确诊为胃腺癌;②年龄18~75岁;③术前未行放疗及生物靶向治疗。最终242例患者入选,其中男179例,女63例;年龄35~75岁,中位年龄60岁。研究经本院伦理委员会审批,所有患者知情同意。

微管蛋白 β 3、胸苷酸合酶(thymidylate synthase, TS)、P糖蛋白、DNA拓扑异构酶2 α (topoisomerase 2-alpha, TOP2A)及切除修复交叉互补酶1(excision repair cross-complementation group 1, ERCC1)抗体,免疫组织化学染色试剂盒及二胺基联苯胺显色试剂盒等均购自珠海泉晖公司。

1.2 方法

1.2.1 侵犯的判断

石蜡包埋的组织样本被切片为5 μ m厚度,行HE染色,神经纤维的神经内膜和神经束周围的神经束膜将形成强染色,如果镜下发现肿瘤细胞已侵犯神经束膜或神经束,则判为神经侵犯。

1.2.2 免疫组化染色检测

采用SP法,按试剂盒的说明书进行操作,PBS作为空白对照,各受检分子的阳性切片作为阳性对照。结果判读采用半定量法,首先每张切片选择10个高倍视野($\times 400$),每个视野计数100个细胞中的阳性细胞数,根据阳性细胞比例分级为:0级(<10%)、1级(10%~25%)、2级(26%~50%)、3级(51%~75%)、4级(76%~100%);然后将染色强度分级为0级(无

着色)、1级(浅棕色)、2级(棕色)、3级(深棕色);最后将染色阳性细胞数比例分级与染色强度等级相乘, ≥ 6 为高表达, < 6 为低表达^[9]。

1.3 统计学方法

采用SPSS19.0统计学软件,计数资料采用双侧 χ^2 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 无和有神经侵犯胃癌患者临床病理特征的比较

242例患者中伴肿瘤神经侵犯者有108例(44.6%)。在伴神经侵犯的胃癌患者中,肿瘤最大径 ≥ 5 cm、低分化、伴肿瘤脉管侵犯及TNM分期III~IV期的比例均显著高于无神经侵犯者($P < 0.05$,表1)。肿瘤细胞侵犯神经的典型样图见图1。

2.2 无和有神经侵犯胃癌患者间耐药相关蛋白表达比较

如图2所示,染色阳性的蛋白为棕褐(黑/黄色),其中阳性染色的TOP2A和TS蛋白主要见于细胞核,阳性染色的ERCC1在胞核和胞质均可见,微管蛋白 β 3和P糖蛋白可见于胞膜和胞浆。有神经侵犯胃癌患者的ERCC1高表达率为63.9%,显著高

表1 无和有神经侵犯胃癌患者临床病理特征的比较
Table 1 Comparison of clinicopathological features between gastric cancer patients with and without PNI

临床病理因素	神经侵犯[n(%)]		χ^2 值	P值
	无	有		
性别			0.001	0.973
男	99(73.9)	80(74.1)		
女	35(26.1)	28(25.9)		
发病年龄			0.027	0.871
≥ 65 岁	41(30.6)	32(29.6)		
< 65 岁	93(69.4)	76(70.4)		
肿瘤最大径*			8.951	0.003
≥ 5 cm	43(33.1)	56(52.3)		
< 5 cm	87(66.9)	51(47.7)		
分化			4.511	0.034
低	50(37.3)	55(50.9)		
高/中	84(62.7)	53(49.1)		
脉管侵犯			14.407	< 0.001
有	31(23.1)	50(46.3)		
无	103(76.9)	58(53.7)		
TNM分期			46.533	< 0.001
III~IV	63(47.0)	96(88.9)		
I~II	71(53.0)	12(11.1)		

*:5例患者缺失数据。

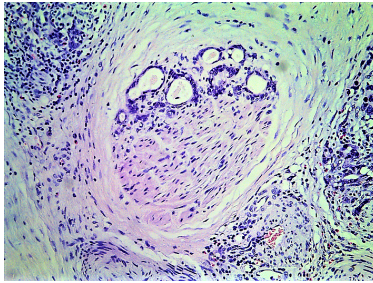


图1 肿瘤细胞侵犯神经示例(免疫组化,×200)
Figure 1 Gastric tumor tissues with PNI(IHC,×200)

于无神经侵犯者的46.5% ($P < 0.05$, 表2), 而微管蛋白β3、TS、P糖蛋白和TOP2A的高表达率在两组间均无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 无和有神经侵犯胃癌患者ERCC1表达水平的亚组比较

如表3所示, 在男性(64.8% vs. 43.1%, $P=0.026$) 和肿瘤低分化的亚组中(76.3% vs. 42.9%, $P=0.006$), 无和有神经侵犯胃癌患者之间的ERCC1高表达率存在显著差异, 而在其他亚组中均未发现

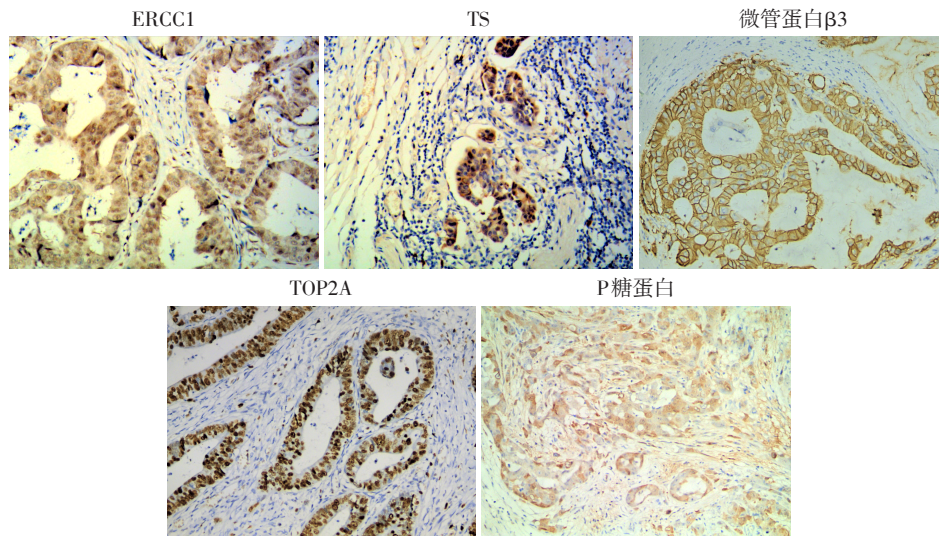


图2 各耐药相关蛋白的阳性染色(免疫组化,×200)
Figure 2 Positive staining of various chemotherapy resistance-related proteins (IHC,×200)

ERCC1 高表达率在无和有神经侵犯的两组间存在显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

神经侵犯是指肿瘤细胞对神经束膜或神经束的侵犯。神经侵犯在胃癌中较为常见, 各项研究中所报道的中位发生率约为41%^[10], 与本研究中的44.6%相仿。神经侵犯的判断主要依据HE染色法或特征性分子的免疫组化检测, 其中HE染色法是目前应用最广泛且简单易行的方法^[11]。

神经侵犯是肿瘤侵袭性强的表现, 与复发转移的高风险及不良预后显著相关^[11]。Suzuk等^[6]在178例接受了术后辅助化疗的I~III期结肠癌患者中发现, 伴神经侵犯者的5年OS和DFS均显著低于无神经侵犯者, 提示伴神经侵犯者的化疗疗效降低。但是, 辅助化疗仍然能够改善伴神经侵犯者的预后, 其OS较单独手术者延长近2倍。Cienfuegos等^[5]回顾性分析了507例I~II期的结肠癌患者, 发现神经侵犯在辅助化疗中是OS和DFS的独立危险因素, 但

辅助化疗较单独手术依然延长了伴神经侵犯者的DFS。Anand等^[7]在83例接受术后放疗和(或)同步化疗的颊部肿瘤患者中同样发现神经侵犯者的2年OS和DFS显著劣于无神经侵犯者。而在胃癌中, Hwang等^[8]回顾性分析了206例接受辅助化疗的患者, 发现神经侵犯和脉管侵犯并存是OS和DFS的独立危险因素, 提示神经侵犯在胃癌中也跟化疗疗效有关。

神经侵犯影响化疗疗效的机制仍不清楚, 我们推测伴神经侵犯者的肿瘤细胞可能存在耐药相关蛋白的高表达, 因此本研究回顾性分析了微管蛋白β3、TS、P糖蛋白、TOP2A及ERCC1等常见耐药相关蛋白的表达水平在有和无神经侵犯者之间的差异。本研究发现, 有神经侵犯者的ERCC1高表达率显著高于无神经侵犯者。ERCC1是核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)的限速酶。NER作为DNA损失修复的主要机制之一, 主要修复各种大片段DNA损伤, 例如紫外线损伤以及包括铂类药物在内的化疗药所致的DNA损伤^[12]。其中, ERCC1具

表2 无和有神经侵犯胃癌患者之间耐药相关蛋白表达水平的比较

Table 2 Comparison of chemotherapy resistance-related protein expression levels between gastric cancer patients with and without PNI

耐药相关蛋白	表达水平	神经侵犯[n(%)]		χ^2 值	P值
		无	有		
微管蛋白 β 3	高	34(37.0)	29(34.5)	0.113	0.737
	低	58(63.0)	55(65.5)		
TS	高	36(61.0)	25(54.3)	0.472	0.492
	低	23(39.0)	21(45.7)		
P糖蛋白	高	28(33.3)	22(29.7)	0.236	0.627
	低	56(66.7)	52(70.3)		
TOP2A	高	54(79.4)	58(79.5)	<0.001	0.995
	低	14(20.6)	15(20.5)		
ERCC1	高	33(46.5)	46(63.9)	4.382	0.036
	低	38(53.5)	26(36.1)		

部分患者未行相应分子标志检测,以实际检测数据为准。

有核酸内切酶活性,能够识别并切割受损的DNA,在NER中发挥关键性作用。研究已证实ERCC1高表达的肿瘤细胞对顺铂等铂类药耐药,其机制与肿瘤细胞对化疗药所致DNA损伤的修复能力增强、从而促进细胞存活有关^[13]。铂类药例如顺铂和奥沙利铂等是胃癌化疗的基础性药物,研究已发现ERCC1高表达是胃癌患者化疗疗效差的重要原因^[14-15]。本研究的发现结合此前关于伴神经侵犯者化疗疗效差的报道,提示ERCC1高表达可能是神经侵犯影响化疗疗效的原因之一。

本研究还发现有和无神经侵犯胃癌患者之间ERCC1高表达率的显著差异主要出现于男性及肿瘤低分化亚组中。我们此前曾报道有和无脉管侵犯胃癌患者之间TOP2A高表达率的显著差异主要出现于女性及肿瘤低分化亚组中^[16]。这些结果表明了性别和分化程度对肿瘤分子特征的影响,同时也是胃癌高度异质性的表现。另外,这些结果也有利于进一步将患者进行分层,筛选出对化疗可能较敏感及特别不敏感的患者,有助于精准治疗的实施。

综上所述,伴神经侵犯胃癌患者的ERCC1蛋白表达显著升高,特别是在男性及肿瘤低分化患者中尤为显著,结合伴神经侵犯者化疗疗效差的相关报道,提示ERCC1高表达可能是这些患者的耐药机制

表3 有和无神经侵犯胃癌患者ERCC1表达水平的亚组比较

Table 3 Comparison of ERCC1 expression levels in subgroups of gastric cancer patients with and without PNI

临床病理因素	ERCC1表达	神经侵犯[n(%)]		χ^2 值	P值	
		无	有			
性别	男	高	22(43.1)	35(64.8)	4.967	0.026
		低	29(56.9)	19(35.2)		
发病年龄	≥65岁	高	11(50.0)	15(78.9)	3.682	0.055
		低	11(50.0)	4(21.1)		
肿瘤最大径	≥5 cm	高	22(44.9)	31(58.5)	1.885	0.170
		低	27(55.1)	22(41.5)		
分化	低	高	12(42.9)	29(76.3)	7.670	0.006
		低	16(57.1)	9(23.7)		
脉管侵犯	有	高	21(48.8)	17(50.0)	0.010	0.919
		低	22(51.2)	17(50.0)		
TNM分期	Ⅲ~Ⅳ	高	10(52.6)	24(63.2)	0.583	0.445
		低	9(47.4)	14(36.8)		
脉管侵犯	无	高	23(44.2)	22(64.7)	3.455	0.063
		低	29(55.8)	12(35.3)		
TNM分期	Ⅰ~Ⅱ	高	18(48.6)	44(66.7)	0.243	0.622
		低	19(51.4)	22(33.3)		
脉管侵犯	有	高	15(44.1)	2(33.3)	3.212	0.073
		低	19(55.9)	4(66.7)		

之一,但仍然需要进一步的细胞功能学及临床研究加以验证。

[参考文献]

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108
- [3] Noh SH, Park SR, Yang HK, et al. Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy

- (CLASSIC) : 5 - year follow - up of an open - label, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15 (12) : 1389-1396
- [4] 雍霞, 卢志强, 王彩莲. 辅助放化疗损伤胃癌术后患者胰腺外分泌功能的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(1):92-94
- [5] Cienfuegos JA, Martínez P, Baixauli J, et al. Perineural Invasion is a major prognostic and predictive factor of response to adjuvant chemotherapy in stage I - II colon cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2017, 24(4):1077-1084
- [6] Suzuki T, Suwa K, Ogawa M, et al. Adjuvant chemotherapy for the perineural invasion of colorectal cancer [J]. *J Surg Res*, 2015, 199(1):84-89
- [7] Anand AK, Agarwal P, Gulia A, et al. Significance of perineural invasion in locally advanced bucco alveolar complex carcinomas treated with surgery and postoperative radiation ± concurrent chemotherapy [J]. *Head Neck*, 2017, 39(7):1446-1453
- [8] Hwang JE, Hong JY, Kim JE, et al. Prognostic significance of the concomitant existence of lymphovascular and perineural invasion in locally advanced gastric cancer patients who underwent curative gastrectomy and adjuvant chemotherapy [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2015, 45(6):541-546
- [9] Li JC, Yang XR, Sun HX, et al. Up-regulation of Krüppel-like factor 8 promotes tumor invasion and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(6):2146-2157
- [10] Deng J, You Q, Gao Y, et al. Prognostic value of perineural invasion in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e88907
- [11] Liebig C, Ayala G, Wilks JA, et al. Perineural invasion in cancer: a review of the literature [J]. *Cancer*, 2009, 115(15):3379-3391
- [12] Bukowska B, Karwowski BT. Actual state of knowledge in the field of diseases related with defective nucleotide excision repair [J]. *Life Sci*, 2018, 195:6-18
- [13] Postel-Vinay S, Soria JC. ERCC1 as predictor of platinum benefit in non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(4):384-386
- [14] Wan J, Chao L, Lee AC, et al. Higher expression of ERCC1 may be associated with resistance to adjuvant platinum-based chemotherapy in gastric cancer [J]. *Cancer Invest*, 2017, 35(2):85-91
- [15] Yamada Y, Boku N, Nishina T, et al. Impact of excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1) on the outcomes of patients with advanced gastric cancer: correlative study in Japan Clinical Oncology Group Trial JCOG9912 [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(10):2560-2565
- [16] 戴东方, 陈德玉, 李小琴, 等. 胃癌组织DNA拓扑异构酶2 α 等8种分子的蛋白表达与脉管侵犯的关系 [J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2018, 28(2):149-153
- [收稿日期] 2019-04-15

(上接第1574页)

- [4] 朱广跃, 杨卫, 吴健, 等. HPLC法定量分析微生物法制备液中产物 γ -氨基丁酸和底物L-谷氨酸 [J]. *食品科学*, 2015, 36(24):190-194
- [5] Dinuzzo M, Mangia S, Maraviglia B, et al. Physiological bases of the K⁺ and the glutamate/GABA hypotheses of epilepsy [J]. *Epilepsy Res*, 2014, 108(6):995-1012
- [6] Olsen RW, Avoli M. GABA and epileptogenesis [J]. *Epilepsia*, 2010, 38(4):399-407
- [7] Coulter DA, Eid T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy [J]. *Glia*, 2012, 60(8):1215-1226
- [8] Cavus I, Kasoff WS, Cassaday MP, et al. Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients [J]. *Ann Neurol*, 2010, 57(2):226-235
- [9] Szczurowska E, Mareš P. NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus [J]. *Physiol Res*, 2013, 62(Suppl 1):S21-S38
- [10] Cho CH. New mechanism for glutamate hypothesis in epilepsy [J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7(7):127
- [11] 吴春风, 黄松明, 郑 帆, 等. 海人酸致痫大鼠海马及脑脊液内氨基酸的变化 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2007, 27(12):1370-1372
- [12] Kang JQ, Barnes G. A common susceptibility factor of both autism and epilepsy: functional deficiency of GABA A receptors [J]. *J Autism Dev Disord*, 2013, 43(1):68-79
- [13] Treiman DM. GABAergic mechanisms in epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2001, 42(Suppl 3):8-12
- [14] Bosetti F, Bell JM, Manickam P. Microarray analysis of rat brain gene expression after chronic administration of sodium valproate [J]. *Brain Res Bull*, 2005, 65(4):331-338
- [15] Sperk G, Schwarzer C, Heilman J, et al. Expression of plasma membrane GABA transporters but not of the vesicular GABA transporter in dentate granule cells after kainic acid seizures [J]. *Hippocampus*, 2010, 13(7):806-815
- [16] Vezzani A, Viviani B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability [J]. *Neuropharmacology*, 2015, 96(Pt A):70-82
- [收稿日期] 2019-04-16